

JP2003344396

Publication Title:

METHOD OF IMMOBILIZING ORIENTATION-CONTROLLED PROTEIN AND
METHOD OF IMMOBILIZING ALIGNED PROTEIN UTILIZING THE SAME

Abstract:

Abstract of JP2003344396

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method of effectively producing an immobilized protein of which only carboxy terminal is immobilized.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-344396

(P2003-344396A)

(43)公開日 平成15年12月3日(2003.12.3)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード*(参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D 4 B 0 3 3
C 0 7 K 17/00	Z N A	C 0 7 K 17/00	Z N A 4 H 0 4 5
C 1 2 N 11/00		C 1 2 N 11/00	
G 0 1 N 37/00	1 0 2	G 0 1 N 37/00	1 0 2

審査請求 有 請求項の数16 O L (全 22 頁)

(21)出願番号 特願2002-148950(P2002-148950)

(22)出願日 平成14年5月23日(2002.5.23)

(71)出願人 301021533

独立行政法人産業技術総合研究所

東京都千代田区霞が関1-3-1

(72)発明者 巖倉 正寛

茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法

人産業技術総合研究所 つくばセンター内

(72)発明者 広田 潔憲

茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法

人産業技術総合研究所 つくばセンター内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 配向制御したタンパク質の固定化方法およびそれを利用したタンパク質の整列固定化方法

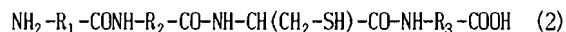
(57)【要約】

【課題】 カルボキシ末端だけで固定化された固定化タンパク質の効率的作製方法の提供。

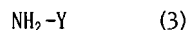
【解決手段】 一般式(1)



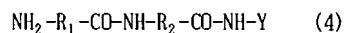
で示されるタンパク質を固定化担体に固定する方法であって、一般式(2)



で示されるスルフヒドリル基を有するタンパク質を作製し、これを一般式(3)



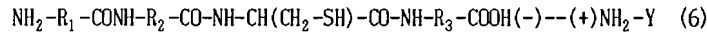
で示される固定化担体に中性条件下にイオン相互作用により吸着固定させ、さらにシアノ化試薬により、一般式(3)で示される固定化担体に吸着させた一般式(2)で示されるタンパク質中のシステイン残基のスルフヒドリル基をシアノ化しシアノシステイン残基に変換させることにより、一般式(4)



で示される固定化タンパク質を作製する方法[上記式中、R₁およびR₂は任意のアミノ酸配列、R₃は中性付近で

強く負に荷電し、かつNH₂-R₁-CONH-R₂-CO-NH-CH(CH₂-SH)-CO-NH-R₃-COOHの等電点を酸性にし得るアミノ酸配列、Yは任意の固定化担体を表す]。

【特許請求の範囲】



で示されるスルフヒドリル基を有するタンパク質を吸着固定化した担体〔上記式中、 R_1 および R_2 は任意のアミノ酸配列、 R_3 は中性付近で強く負に荷電し、かつ $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CONH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-R}_3\text{-COOH}$ の等電点を酸性にし得るアミノ酸配列、 Y は任意の固定化担体、 $(-)-(+)$ はイオン結合で吸着結合している状態を表す〕。

【請求項2】 一般式(6)の担体が、 $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CONH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-CH(CH}_3\text{)-CO-[NH-CH(CH}_2\text{-COOH)-C(O)n-OH(-)--(+)\text{NH}_2\text{-Y}}$ (式中、 R_1 および R_2 は任意のアミノ酸配列、 n は自然数、 $(-)-(+)$ はイオン結合で吸着結合している状態を表す) で示される、請求項1記載の固定化担体。

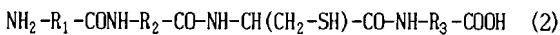
【請求項3】 R_2 が、ポリグリシンである、請求項1または2に記載の固定化担体。

【請求項4】 R_1 が酵素である請求項1から3のいずれか1項に記載の固定化担体。

【請求項5】 一般式(1)



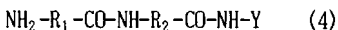
で示されるタンパク質を固定化担体に固定する方法であって、一般式(2)



で示されるスルフヒドリル基を有するタンパク質を作製し、これを一般式(3)



で示される固定化担体に中性条件下にイオン相互作用により吸着固定させ、さらにシアノ化試薬により、一般式(3)で示される固定化担体に吸着させた一般式(2)で示されるタンパク質中のシステイン残基のスルフヒドリル基をシアノ化しシアノシステイン残基に変換させることにより、一般式(4)



で示される固定化タンパク質を作製する方法〔上記式中、 R_1 および R_2 は任意のアミノ酸配列、 R_3 は中性付近で強く負に荷電し、かつ $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CONH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-R}_3\text{-COOH}$ の等電点を酸性にし得るアミノ酸配列、 Y は任意の固定化担体を表す〕。

【請求項6】 一般式(2)のタンパク質が、 $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CONH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-CH(CH}_3\text{)-CO-[NH-CH(CH}_2\text{-COOH)-C(O)n-OH}$ (式中、 R_1 および R_2 は任意のアミノ酸配列、 n は自然数を表す) で示されるスルフヒドリル基を有するタンパク質である、請求項5記載の固定化タンパク質を作製する方法。

【請求項7】 一般式(2)のタンパク質中の R_2 がポリグリシンである、請求項5または6記載の固定化タンパク質を作製する方法。

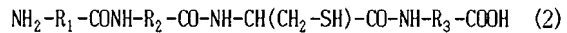
【請求項8】 一般式(2)のタンパク質中の R_1 が酵素である請求項5から7のいずれか1項に記載の固定化タンパク質を作製する方法。

【請求項1】 一般式(6)

【請求項9】 一般式(1)



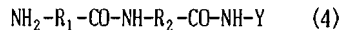
で示されるタンパク質を固定化基板に固定し、タンパク質アレイを作製する方法であって、一般式(2)



で示されるスルフヒドリル基を有するタンパク質を作製し、これを一般式(3)



で示される固定化基板に、整列化しながら吸着固定させ、シアノ化試薬により、一般式(3)で示される固定化担体に吸着させた一般式(2)で示されるタンパク質中のシステイン残基のスルフヒドリル基をシアノ化しシアノシステイン残基に変換させることにより、一般式(4)



で示される固定化タンパク質を有するタンパク質アレイを作製する方法〔上記式中、 R_1 および R_2 は任意のアミノ酸配列、 R_3 は中性付近で強く負に荷電し、かつ $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CONH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-R}_3\text{-COOH}$ の等電点を酸性にし得るアミノ酸配列、 Y は任意の固定化基板を表す〕。

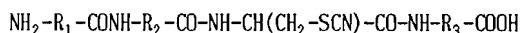
【請求項10】 固定化基板に整列化しながら吸着させる方法が、インクジェット方式によるものである、請求項9記載のタンパク質アレイを作製する方法。

【請求項11】 システイン残基のスルフヒドリル基のシアノ化を行うシアノ化試薬を、インクジェットプリンタを用いて作用させる、請求項10記載のタンパク質アレイを作製する方法。

【請求項12】 一般式(1)



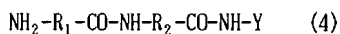
で示されるタンパク質を固定化基板に固定し、タンパク質アレイを作製する方法であって、一般式



で示されるシアノ基を有するタンパク質を作製し、これを一般式(3)



で示される固定化基板に整列化しながら吸着固定させることにより、一般式(4)

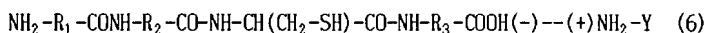


で示される固定化タンパク質を有するタンパク質アレイを作製する方法〔上記式中、 R_1 および R_2 は任意のアミノ酸配列、 R_3 は中性付近で強く負に荷電し、かつ $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CONH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-R}_3\text{-COOH}$ の等電点を酸性にし得るアミノ酸配列、 Y は任意の固定化基板を表す〕。

【請求項13】 固定化基板に整列化しながら吸着させる方法が、インクジェット方式によるものである、請求項12記載のタンパク質アレイを作製する方法。

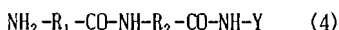
【請求項14】 一般式(2)のタンパク質が、 $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-}$

$\text{CONH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-CH(CH}_3\text{)-CO-[NH-CH(C}$
 $\text{H}_2\text{-COOH)-CO]}_n\text{-OH}$ (式中、 R_1 および R_2 は任意のアミノ酸
 配列、 n は自然数を表す) で示されるスルフヒドリル基



で示されるスルフヒドリル基を有するタンパク質が整列
 吸着したタンパク質アレイ [上記式中、 R_1 および R_2 は任
 意のアミノ酸配列、 R_3 は中性付近で強く負に荷電し、か
 つ $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CONH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-R}_3\text{-COOH}$ の
 等電点を酸性にし得るアミノ酸配列、 Y は任意の固定化
 基板、(--) (++) はイオン結合で吸着結合している状態を
 表す]。

【請求項 16】 一般式 (4)



で示されるタンパク質が整列固定化したタンパク質アレ
 イ [上記式中、 R_1 および R_2 は任意のアミノ酸配列、 Y は任
 意の固定化基板を表す]。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は固定化タンパク質に
 関する。本発明は、さらに配向制御した固定化タンパク
 質に関する。具体的には、本発明はカルボキシ末端だけ
 で固定化された固定化タンパク質の効率的な作製に関す
 る。さらに、本発明は固定化担体 (基体、基板) 上に整
 列化した状態で配向制御した固定化タンパク質を有する
 タンパク質アレイの作製方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来より、可溶性のタンパク質を、例え
 ばアガロースゲルなどの不溶性担体と結合させ、固定化
 タンパク質として利用することが試みられていた。例え
 ば、酵素タンパク質を不溶性担体に結合した固定化酵素
 の開発およびそれを利用した酵素反応器の作製等が行わ
 れていた。

【0003】酵素の固定化には、タンパク質を構成する
 アミノ酸の側鎖の反応性を利用して、不溶性担体と化学
 的に結合することが主に行われていた。例えば、システ
 イン残基には、官能基としてSH基があり、SH基の反応と
 して、ジスルヒド化、アルキル化、アシル化などが知ら
 れており、この反応を利用することにより、システイン
 残基の側鎖を介してタンパク質の固定化を行うことがで
 きる。また、リジン残基は、アミノ基を側鎖に有する。
 このアミノ基は、カルボジイミドを用いカルボキシル基
 とアミド結合を形成できる。同様に、アスパラギン酸及
 びグルタミン酸はカルボキシル基を有することから、カ
 ルボジイミドを用い一級アミンとアミド結合を形成する
 ことができる。しかし、このような側鎖の官能基を利用
 する固定化反応は、タンパク質のアミノ酸配列に依存
 し、またタンパク質中には同種のアミノ酸が複数含まれ
 ることから固定化部位を特定できず、さらに複数の箇所
 で固定化される可能性が排除できない等の問題があっ
 た。

を有するタンパク質である、請求項9から11のいずれ
 か1項に記載のタンパク質アレイを作製する方法。

【請求項 15】 一般式 (6)

【0004】これらの問題を解消するために、シアノシ
 ステイン残基を介したアミド結合形成反応を利用してタ
 ンパク質のカルボキシ末端のカルボキシル基を介して固
 定化する反応が開発され (特開平10-45798号公報参
 照)、タンパク質をカルボキシ末端の一箇所でも主鎖
 を介して結合する手段が開発されている (特許第304702
 0号公報参照)。タンパク質をカルボキシ末端の一箇所
 で主鎖を介して結合することにより、変性の可逆性
 を高めることができ、固定化タンパク質の熱殺菌を可能
 にする固定化酵素を作製できるなどの利点が得られた。

【0005】しかしながら、シアノシステイン残基を介
 したアミド結合形成反応は、反応式 (a) $\text{NH}_2\text{-R-CO-NH-CH}$
 $(\text{CH}_2\text{-SCN})\text{-CO-X} + \text{NH}_2\text{-B} \rightarrow \text{NH}_2\text{-R-CO-NH-B}$ (式中、 R
 は任意のアミノ酸残基の連鎖、 X は、 OH もしくは任意
 のアミノ酸残基もしくは任意のアミノ酸残基の連鎖、 $\text{NH}_2\text{-B}$
 は任意の一級アミン化合物を表す。) で表される。

【0006】このアミド結合形成反応は、反応式 (b) $\text{NH}_2\text{-R-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SCN)-CO-X} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_2\text{-R-COOH} + \text{Z}$
 (式中、 R は任意のアミノ酸残基の連鎖、 X は、 OH も
 しくは任意のアミノ酸残基もしくは任意のアミノ酸残基
 の連鎖、 Z は X の2-イミノチアゾリン-4-カルボキシル
 誘導体を表す。) で表されるペプチド鎖切断反応 (G.
 R. Jacobson, M. H. Schaffer, G. R. Stark, T. C. Vanaman,
 J. Biological Chemistry, 248, 6583-6591 (1973) 参
 照)、及び反応式 (c) $\text{NH}_2\text{-R-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SCN)-CO-X}$
 $\rightarrow \text{NH}_2\text{-R-CO-NH-C(CH}_2\text{)-CO-X}$ (式中、 R は任意のアミノ
 酸残基の連鎖、 X は、 OH もしくは任意のアミノ酸残基
 もしくは任意のアミノ酸残基の連鎖を表す。) で示され
 るチオシアノ基が脱離する、 β -脱離反応でシアノシス
 テイン残基がデヒドロアラニンに転換する反応 (Y. Dega
 ni, A. Patchornik, Biochemistry, 13, 1-11 (1974) 参
 照) の反応と競争的に起こることから、反応収率に関し
 て問題が生じた。すなわち、反応式 (a) を用いたタンパ
 ク質の固定化は、カルボキシ末端の一箇所でも主鎖を
 介して結合できるという長所をもちながら、固定化収率
 において難点を有することが問題点としてあげられてい
 た。

【0007】この問題点を解消するために、シアノシス
 テイン残基を有し中性付近で負に荷電するペプチド配列
 をカルボキシ末端側に有するペプチドと、固定化しよう
 とするタンパク質を一級アミンを有する固定化担体と反
 応させて、固定化タンパク質を効率よく製造する方法も
 開発されている (特許第3047020号公報参照)。

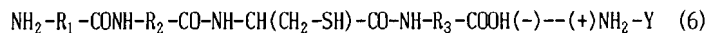
【0008】しかし、このような事前にリンカーペプチ
 ド鎖中のシステイン残基をシアノ化し、その後リンカー
 ペプチド鎖中に導入した陰電荷を示すペプチド配列と基

板とのイオン相互作用による吸着による固定化反応の場合、シアノ化システインによる切断反応およびジヒドロアラニン生成反応の副反応がシアノ化システイン形成後、時間とともに増大するため、固定化反応効率の低下を招くという問題があった。さらに、均質な酵素反応器の作製も不可能であった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、タンパク質を配向制御して担体に結合する方法およびタンパク質が担体に配向制御されて結合しているタンパク質結合担体の提供を目的とする。具体的には、シアノシステインを介したアミド結合形成反応を利用してタンパク質を配向制御して担体に結合する方法において、固定化しようとするタンパク質にスルフヒドリル基を有するシステイン残基を含むタンパク質を融合させたタンパク質を、固定化担体に吸着させ、シアノ化試薬により前記スルフヒドリル基をシアノ化し、固定化しようとするタンパク質を固定化する方法の提供を目的とする。本発明は、さらに

〔1〕一般式(6)



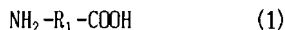
で示されるスルフヒドリル基を有するタンパク質を吸着固定化した担体〔上記式中、 R_1 および R_2 は任意のアミノ酸配列、 R_3 は中性付近で強く負に荷電し、かつ $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CONH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-R}_3\text{-COOH}$ の等電点を酸性にし得るアミノ酸配列、 Y は任意の固定化担体、 $(-)-(+)$ はイオン結合で吸着結合している状態を表す〕、

【0012】〔2〕一般式(6)の担体が、 $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CONH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-CH(CH}_3\text{)-CO-(NH-CH(CH}_2\text{-COOH)-CO)}_n\text{-OH(-)--(+)\text{NH}_2\text{-Y}}$ 〔式中、 R_1 および R_2 は任意のアミノ酸配列、 n は自然数、 $(-)-(+)$ はイオン結合で吸着結合している状態を表す〕で示される、〔1〕記載の固定化担体、

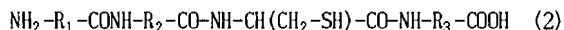
【0013】〔3〕 R_2 が、ポリグリシンである、〔1〕または〔2〕に記載の固定化担体、

【0014】〔4〕 R_1 が酵素である〔1〕から〔3〕のいずれかに記載の固定化担体、

【0015】〔5〕一般式(1)



で示されるタンパク質を固定化担体に固定する方法であって、一般式(2)



で示されるスルフヒドリル基を有するタンパク質を作製し、これを一般式(3)



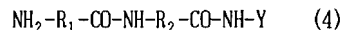
で示される固定化担体に中性条件下にイオン相互作用により吸着固定させ、さらにシアノ化試薬により、一般式(3)で示される固定化担体に吸着させた一般式(2)で示されるタンパク質中のシステイン残基のスルフヒドリル基をシアノ化しシアノシステイン残基に変換させることにより、一般式(4)

例えば、インクジェットプリンタの原理などを利用してあらかじめ整列化して担体に吸着させることを可能とすることから、配向制御して担体にタンパク質を結合させてタンパク質アレイを得る方法およびタンパク質が配向制御されて固定化しているタンパク質アレイの提供を目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、タンパク質をそのタンパク質が有する機能性を保持したまま固定化担体に結合する方法について鋭意検討を行った結果、固定化しようとするタンパク質にスルフヒドリル基を有し中性付近で負に荷電するペプチド配列を結合させたタンパク質を作製し、固定化担体に吸着させた後に、前記スルフヒドリル基をシアノ化することにより、タンパク質を配向制御して効率的に固定化担体に結合させることができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0011】すなわち、本発明の態様は以下のとおりである。



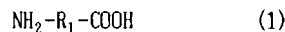
で示される固定化タンパク質を作製する方法〔上記式中、 R_1 および R_2 は任意のアミノ酸配列、 R_3 は中性付近で強く負に荷電し、かつ $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CONH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-R}_3\text{-COOH}$ の等電点を酸性にし得るアミノ酸配列、 Y は任意の固定化担体を表す〕、

【0016】〔6〕一般式(2)のタンパク質が、 $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CONH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-CH(CH}_3\text{)-CO-(NH-CH(CH}_2\text{-COOH)-CO)}_n\text{-OH}$ 〔式中、 R_1 および R_2 は任意のアミノ酸配列、 n は自然数を表す〕で示されるスルフヒドリル基を有するタンパク質である、〔5〕記載の固定化タンパク質を作製する方法、

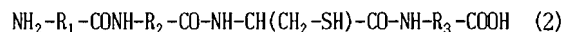
【0017】〔7〕一般式(2)のタンパク質中の R_2 がポリグリシンである、〔5〕または〔6〕記載の固定化タンパク質を作製する方法、

【0018】〔8〕一般式(2)のタンパク質中の R_1 が酵素である〔5〕から〔7〕のいずれかに記載の固定化タンパク質を作製する方法、

【0019】〔9〕一般式(1)



で示されるタンパク質を固定化基板に固定し、タンパク質アレイを作製する方法であって、一般式(2)

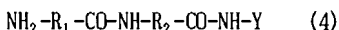


で示されるスルフヒドリル基を有するタンパク質を作製し、これを一般式(3)



で示される固定化基板に、整列化しながら吸着固定させ、シアノ化試薬により、一般式(3)で示される固定化基板に吸着させた一般式(2)で示されるタンパク質中のシステイン残基のスルフヒドリル基をシアノ化しシアノ

システイン残基に変換させることにより、一般式(4)



で示される固定化タンパク質を有するタンパク質アレイを作製する方法[上記式中、 R_1 および R_2 は任意のアミノ酸配列、 R_3 は中性付近で強く負に荷電し、かつ $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CO-NH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-R}_3\text{-COOH}$ の等電点を酸性にし得るアミノ酸配列、 Y は任意の固定化基板を表す]、

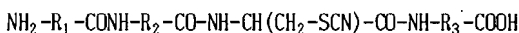
【0020】【10】 固定化基板に整列化しながら吸着させる方法が、インクジェット方式によるものである、[9]記載のタンパク質アレイを作製する方法。

【0021】【11】 システイン残基のスルフヒドリル基のシアノ化を行うシアノ化試薬を、インクジェットプリンタを用いて作用させる、[10]記載のタンパク質アレイを作製する方法、

【0022】【12】 一般式(1)

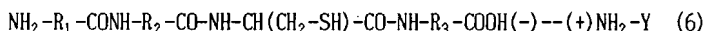


で示されるタンパク質を固定化基板に固定し、タンパク質アレイを作製する方法であって、一般式



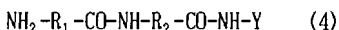
で示されるシアノ基を有するタンパク質を作製し、これ

【15】 一般式(6)



で示されるスルフヒドリル基を有するタンパク質が整列吸着したタンパク質アレイ[上記式中、 R_1 および R_2 は任意のアミノ酸配列、 R_3 は中性付近で強く負に荷電し、かつ $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CONH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-R}_3\text{-COOH}$ の等電点を酸性にし得るアミノ酸配列、 Y は任意の固定化基板、(-)--(+))はイオン結合で吸着結合している状態を表す]、および

【0026】【16】 一般式(4)



で示されるタンパク質が整列固定化したタンパク質アレイ[上記式中、 R_1 および R_2 は任意のアミノ酸配列、 Y は任意の固定化基板を表す]。以下、本発明を詳細に説明する。

【0027】

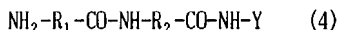
【発明の実施の形態】1. 本発明の方法によるタンパク質の吸着固定化

本発明のタンパク質の配向制御した固定化方法により、タンパク質をその活性を保持したまま効率よく担体上に固定化できる。固定化させるタンパク質は限定されず、用途に応じてあらゆるタンパク質を固定化することができる。例えば、酵素を固定化させて酵素反応器を作製することもできるし、固定化したタンパク質の特異的分子間相互作用を利用した分離用担体の作製や特定の抗原または抗体を固定化させて抗原抗体反応を利用した診断用抗原または抗体を固定化した担体を作製することもできる。また、任意のタンパク質を固定化させてプロテオミクス等の解析ツールを作製することもできる。

を一般式(3)



で示される固定化基板に整列化しながら吸着固定させることにより、一般式(4)



で示される固定化タンパク質を有するタンパク質アレイを作製する方法[上記式中、 R_1 および R_2 は任意のアミノ酸配列、 R_3 は中性付近で強く負に荷電し、かつ $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CO-NH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-R}_3\text{-COOH}$ の等電点を酸性にし得るアミノ酸配列、 Y は任意の固定化基板を表す]、

【0023】【13】 固定化基板に整列化しながら吸着させる方法が、インクジェット方式によるものである、[12]記載のタンパク質アレイを作製する方法。

【0024】【14】 一般式(2)のタンパク質が、 $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CONH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-CH(CH}_3\text{)-CO-(NH-CH(CH}_2\text{-COOH)-CO)}_n\text{-OH}$ (式中、 R_1 および R_2 は任意のアミノ酸配列、 n は自然数を表す)で示されるスルフヒドリル基を有するタンパク質である、[9]から[11]のいずれかに記載のタンパク質アレイを作製する方法、

【0025】

【0028】本発明において、物質が固定化担体に結合し不動化することを固定化といい、共有結合による結合および共有結合によらない静電相互作用等による結合も含む。以下において、物質が吸着により担体上に固定化した状態と共有結合により固定化した状態の区別を明確にするべく、前者の状態を吸着または吸着固定化と称している。

【0029】本発明を実施するに当たり、最初に一般式(1) $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-COOH}$ で示されるタンパク質の固定化のために、一般式(2) $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CO-NH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-R}_3\text{-COOH}$ で示されるタンパク質を作製する必要がある。これらの一般式中、 R_1 および R_2 は任意のアミノ酸配列、 R_3 は、中性付近で強く負に荷電し、且つ $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CO-NH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-R}_3\text{-COOH}$ の等電点を酸性にできる任意のアミノ酸残基の連鎖を表す。 R_2 は、上記一般式(1)で示される固定化しようとするタンパク質と担体との間のリンカーペプチドとなる。 R_2 は任意でありそのアミノ酸の種類、数ともに限られないが、例えばGly-Gly-Gly等を用いることができる。上記一般式(1)で示されるタンパク質をコードする遺伝子と一般式(5) $\text{NH}_2\text{-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-R}_3\text{-COOH}$ (式中、 R_2 および R_3 は上記の意味を有する。)で示されるペプチド配列をコードする遺伝子とを結合することにより、一般式(2) $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CO-NH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-R}_3\text{-COOH}$ で示される融合タンパク質をコードする遺伝子を作製し、これを大腸菌などの宿主生物で発現させ、その後、発現したタンパク質を分離精製することにより得ること

ができる。このような融合タンパク質は公知技術(例えば、M. Iwakura et al., J. Biochem. 111:37-45(1992)参照)を利用することにより、実施することができる。あるいは、上記融合タンパク質は、遺伝子工学的手法と慣用のタンパク質合成技術との組み合わせ、または、タンパク質合成技術のみによっても作製することができる。

【0030】上記一般式(2)および(5)における R_3 としては、アスパラギン酸やグルタミン酸を多く含む配列が好適である。タンパク質の等電点は、構成するアミノ酸の種類と数に依存する。例えば、リジンやアルギニンなどの塩基性アミノ酸を多く含む場合は、塩基性アミノ酸の総数を超える数のアスパラギン酸やグルタミン酸が必要である。タンパク質の等電点の計算は、当業者であれば容易に計算により推定できる。好ましくは、上記一般式(2)の物質の等電点を4から5の間の値になるように、アスパラギン酸やグルタミン酸を多く含む配列をデザインすればよい。

【0031】そのような配列のうち好適な配列としてアラニル-ポリアスパラギン酸をあげることができる。なぜならば、シアノシステインの次のアミノ酸をアラニンにすることにより、シアノシステイン残基を介したアミド結合形成反応が生じやすいことと、アミノ酸側鎖の中でアスパラギン酸のカルボキシル基が最も酸性であるからである。

【0032】このようにして得られた上記一般式(2)のタンパク質を固定化担体に吸着固定化する。本発明に用いられる一般式(3)「 NH_2-Y 」で示される固定化担体としては、一級アミノ基を有する不溶性担体であれば何でも用いることができる。固定化担体としてはゲル状、ビーズ状、粒子状、プレート状等あらゆる形状のものが使用可能である。一級アミノ基を有する市販の担体としては、アミノ-セルロース(生化学工業で販売)、AF-アミノトヨパール(TOSOHで販売)、EAE-セファロース4B及びリジン-セファロース4B(アマシャムファルマシアで販売)、アフィゲル102(バイオラッドで販売)、ボラス20NH(ベーリンガーマンハイムで販売)などが利用可能である。また、シラン化合物で一級アミンを有する化合物(例えば、3-アミノプロピルメトキシシランなど)を用いてガラスビーズ、ガラスプレートなどに一級アミンを導入し、利用することも可能である。

【0033】一般式(2)〔即ち、上記式 $NH_2-R_1-CO-NH-R_2-CO-NH-CH(CH_2-SH)-CO-NH-R_3-COOH$ 〕で示されるスルフィド基を有するタンパク質と一般式(3)〔即ち、上記式 NH_2-Y 〕で示される固定化担体の反応は、中性から弱アルカリ条件下(pH7~10)に、室温で行うことができる。弱アルカリ反応条件化において、上記一般式(2)で示されるタンパク質は負に帯電し、一方、上記一般式(3)で示される固定化担体は正に帯電し、静電相互作用により互いに吸着結合することから、前記反応式(a)で示さ

れるアミド結合形成反応のキャプチャー反応として利用できる。この静電相互作用は溶媒中の塩濃度に依存することから、用いられる溶媒としてはできるだけ塩濃度が低いものが好ましい。例えば、10mM磷酸緩衝液(pH7~9)を用いることができるが、静電相互作用が適正に行われる塩濃度であればどのような条件でも可能である。

【0034】従って、吸着反応を行う溶液としては、上記静電相互作用を保証し、且つ、一般式(2)で示されるタンパク質が溶解し得る溶媒で且つpHを調整できる溶媒であればいかなる溶液も利用可能である。リン酸緩衝液、硼酸緩衝液などの種々の緩衝液、メタノール、エタノールなどのアルコール類の他、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドなどが利用可能である。反応温度は、室温で高い反応効率を得られるが、用いる溶媒が凍結もしくは沸騰しない範囲、及び上記一般式(2)で示されるタンパク質が変性の結果凝集しない温度範囲であれば問題なく用いることができる。

【0035】上記一般式(2)で示されるタンパク質は、上記工程により一般式(3)で示される担体 NH_2-Y に静電相互作用により吸着結合している。該結合の強さは、塩濃度等の変化により変化し得るが、強く結合している状態を保つ限り、固定化担体に吸着した状態の一般式

(6) $NH_2-R_1-CO-NH-R_2-CO-NH-CH(CH_2-SH)-CO-NH-R_3-COOH$ (--) (--) NH_2-Y で示される状態 (--) (--) はイオン結合で吸着結合している状態を表す) のタンパク質も種々の用途に利用することができる。例えば、タンパク質が酵素ならば固定化担体を酵素反応器として用いることができる。この場合、固定化担体として、ゲル、粒子あるいはビーズ状物質を用いた場合、これらの物質を、カラム等の適当な支持体に充填して効率よく酵素反応器として用いることができる。タンパク質が特定の抗原または抗体ならば抗原抗体反応を利用した診断用デバイス等として用いることができる。また、上記一般式(2)で示される固定化担体に吸着した状態のタンパク質は例えば、1MのKCl等の高塩濃度溶液で処理することにより容易に離脱し得、 $NH_2-R_1-CO-NH-R_2-CO-NH-CH(CH_2-SH)-CO-NH-R_3-COOH$ として回収することができる。この性質を利用すれば、担体上に特定の物質と相互作用し得るタンパク質を吸着固定化させておき、該特定の物質を含む溶液と接触させ、その後吸着した固定化タンパク質を担体から離脱させることにより該特定の物質を吸着固定化タンパク質と結合した状態で回収することが可能である。その後、該物質をタンパク質と分離させることにより該物質のみを取得することも可能である。相互作用し得るタンパク質と物質の組み合わせは、抗体および抗原、リガンドとレセプター、酵素と基質等タンパク質同士、タンパク質と非タンパク質の組み合わせ等あらゆる組み合わせを含む。この技術を利用することにより、特定の物質の濃縮、分離が効率的に行うことができる。さらに、上記一般式(6) $NH_2-R_1-CO-NH-R_2-CO-NH-CH(CH_2-SH)-CO-NH-R_3-C$

OOH(-)-(+)NH₂-Yで示される固定化担体に吸着結合した状態のタンパク質を以下に述べるようにシアノ化処理することにより、タンパク質が担体と共有結合により強固に結合し、安定なタンパク質固定化担体を得ることができる。すなわち、上記一般式(6)で示される、タンパク質を吸着固定化した担体は、一般式(4) NH₂-R₁-CO-NH-R₂-CO-NH-Yで示される共有結合によりタンパク質が強固に固定化された固定化タンパク質製造の中間体としても用いることができる。

【0036】上記一般式(2)のタンパク質を固定化担体へ吸着固定化し、シアノ化反応を行うことにより、上記一般式(4)で示される固定化担体に共有結合で固定化された固定化タンパク質を作製することができる。この際、固定化担体に吸着したタンパク質配列中に導入したリンカーペプチド鎖中のシステイン残基のスルフヒドリル基がシアノ化反応を受け、シアノ化されたシステイン残基の直前のアミノ酸残基の間で結合が生じる。

【0037】シアノ化反応は、シアノ化試薬を用いて行うことができる。シアノ化試薬としては、通常、2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸(2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid (NTCB)) (Y. Degani, A. Ptchornik, Biochemistry, 13, 1-11 (1974)参照)または、1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロボロ酸(1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP))などを用いる方法が簡便である。NTCBおよびCDAPは市販のものをそのまま用いることができる。NTCBを用いたシアノ化は、pH7~9の間で効率よく行うことができ、且つ遊離するチオニトロ安息香酸の412nmの吸光度の増加(分子吸光係数=13,600M⁻¹cm⁻¹)で反応効率を調べることができる。また、SH基のシアノ化は文献(J. Wood & Catsipoolas, J. Biol. Chem. 233, 2887(1963)参照)の記載の方法に従っても行うことができる。シアノ化試薬によるシアノ化は、固定化担体上に一般式(2) NH₂-R₁-CO-NH-R₂-CO-NH-CH(CH₂-SH)-CO-NH-R₃-COOHで示されるタンパク質を吸着固定化した後に行っても、吸着固定化と同時に進行してもよい。後者の場合、上記一般式(2)で示されるタンパク質とシアノ化試薬を同時に固定化担体上に適用すればよい。

【0038】本発明で用いるシアノシステインが関与する反応には、副反応として加水分解反応が起こりうるが、このような可能な副反応から生成する反応物は全て溶媒に溶けるため、反応後、固定化担体を適当な溶媒で洗うことにより副反応生成物を取り除くことができる。従って、本発明で用いられる固定化反応により作製される固定化タンパク質は全て一般式(4) NH₂-R₁-CO-NH-R₂-CO-NH-Y(式中、R₁、R₂およびYは上記の意味を有する。)で表され、目的とするタンパク質のカルボキシ末端一箇所固定化担体に結合する。

【0039】このようにして得られた固定化タンパク質の特徴としては、担体にカルボキシ末端が一箇所だけで

結合していることがあげられるが、このことによりタンパク質の機能が良好に発揮される。例えば、固定化タンパク質として触媒機能を有する酵素タンパク質を用いた場合、温度を上げるとか、変性剤を加えることにより一度変性させると、触媒機能を失うが、本発明の固定化によって作製した固定化酵素は、変性させる条件を取り除くことにより、その機能を完全に再生することができる。

【0040】本発明の方法により一般式(1)で示されるタンパク質を80%以上の高効率で固定化することができ、また固定化されたタンパク質の機能はほぼ100%保持される。この方法により、タンパク質は固定化担体に安定に強固に固定化される。固定化するタンパク質が酵素ならば固定化担体を酵素反応器として用いることができる。この場合、固定化担体として、ゲル、粒子あるいはビーズ状物質を用いた場合、これらの物質を例えば、カラム等の適当な支持体に充填して効率よく酵素反応器として用いることができる。タンパク質が特定の抗原または抗体ならば抗原抗体反応を利用した診断用デバイス等として用いることができる。

【0041】なお、固定化反応に使用されなかった一般式(3) NH₂-Yで示される一級アミノを有する担体中のアミノ基のマスクも一般式(2)で示される配列を有する低分子ペプチドを用いることにより行うことができる。例えば、一般式(2)に該当する低分子ペプチドとして、アラニン-システイン-アスパラギン酸なる配列のペプチドを化学合成し、一般式(4) NH₂-R₁-CO-NH-R₂-CO-NH-Yで示される固定化タンパク質担体に再度アラニン-システイン-アスパラギン酸を吸着固定化し、その後シアノ化反応を行うことにより、未反応の一級アミンにアラニン残基を結合することができる。

【0042】以下に、本発明によるタンパク質の固定化方法の工程の概要を例示する。

【0043】固定化対象タンパク質遺伝子改変による固定化のための配列付加

改変タンパク質の取得(発現・分離・精製)

イオン相互作用による一級アミン担体への吸着

吸着タンパク質のシステインのSH基のシアノ化

シアノシステインを介したペプチド結合生成反応による固定化

固定化されていないタンパク質の担体からの除去

担体中のフリーの一級アミンのマスク

配向制御固定化タンパク質の取得

このうち、イオン相互作用による一級アミン担体への吸着、吸着タンパク質のシステインのSH基のシアノ化の工程は、以下に詳述するタンパク質アレイ作製技術のために重要である。

【0044】2. 整列化しながら固定化させる方法によるタンパク質アレイ作製

本発明のタンパク質の固定化の方法を用いて、タンパク

質を整列化しながら基体もしくは基板（以下、基板と称する）上に固定化させタンパク質アレイを作製することができる。本発明で、タンパク質アレイとは、ガラス、ナイロン膜等の基板上に１種類以上のタンパク質を高密度に整列固定化させたものであり、タンパク質チップともいう。タンパク質アレイにおいて、タンパク質は極めて高密度に固定化されるため、少量のタンパク質を効率よくしかも配向制御して固定化する必要がある。従って、タンパク質を高い効率で配向制御して固定化しうる本発明の方法は、タンパク質アレイの作製に適している。

【００４５】本発明の方法により、タンパク質を整列化しながら固定化するには、まず一般式(2) $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CONH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-R}_3\text{-COOH}$ で示されるスルフヒドリル基を有するタンパク質を一般式(4)で示される $\text{NH}_2\text{-Y}$ で示されるシート状の固定化担体（基板）上に整列化吸着させる。ここで、タンパク質アレイ作製に用いられるタンパク質を固定化する基板は限られず、 NH_2 基を導入したシート状のものならばいかなる基板も使用できる。使用できる担体として上述の担体、アミノ基を上述の方法で導入したナイロン膜、ガラス板等を用いることができる。

【００４６】整列化の方法も限られず、基板上にタンパク質溶液を高密度に整列化できる方法ならばいかなる方法も用い得る。例えば、基板上にタンパク質溶液をスポットするアレイヤーを用いればよい。スポットするアレイヤーには、ピン、羽ペン、インクジェット、キャピラリー、ピン&リング等種々の方法があり、いずれの方法を用いてもよい。また、ピッキングロボットを用いてもよい。タンパク質アレイは、通常基板上にタンパク質溶液をドット状にスポットして固定化するが、後述のように例えばインクジェット方式によればライン状に固定化することもできる。本発明においては、いかなる形状でも基板上に１種類以上のタンパク質が整列している場合、それをタンパク質アレイという。

【００４７】上記種々の方法により、一般式(2) $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CONH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-R}_3\text{-COOH}$ で示されるスルフヒドリル基を有するタンパク質を一般式(4)で示される $\text{NH}_2\text{-Y}$ で示される固定化基板上に中性から弱アルカリ条件下（ $\text{pH}7\sim10$ ）に整列化することにより、タンパク質 R_1 が $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CONH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-R}_3\text{-COOH}$ (-) - (+) $\text{-NH}_2\text{-Y}$ の式 (-) - (+) はイオン結合で吸着結合している状態を表す）により基板上に吸着したタンパク質アレイが得られる。さらに、この式で表される吸着したタンパク質をシアノ化試薬で処理することにより、 $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CO-NH-R}_2\text{-CO-NH-Y}$ の式で示されるタンパク質 R_1 が共有結合により基板上に整列固定化されたタンパク質アレイを得ることができる。シアノ化処理は、基板のタンパク質が吸着した表面にシアノ化剤を添加すれば行える。また、タンパク質が吸着した基板ごとシアノ化

剤中に浸漬する等の手段によってシアノ化することもできる。また、上述の整列化手段によりタンパク質を吸着した後、同様の整列化手段を用いて基板上のタンパク質が吸着した部分にシアノ化試薬を適用してもよい。例えば、ピンを用いてタンパク質を一定のドットパターンで基板上に吸着整列化した後に、ピンを用いてタンパク質の代わりにシアノ化試薬溶液をタンパク質に重ねるようにしてスポットすれば、シアノ化反応が起こりタンパク質が固定化される。また、固定化基板に一般式(2) $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CONH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-R}_3\text{-COOH}$ で示されるタンパク質と、シアノ化試薬を同時に適用してもよい。

【００４８】以下に、整列化の一例としてインクジェット方式による整列化について詳述する。

【００４９】本発明のタンパク質の固定化に、インクジェットプリンティング技術を利用して、タンパク質アレイを作製することができる。

【００５０】本発明のタンパク質の固定化工程中、一般式(2) $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CO-NH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-R}_3\text{-COOH}$ で示されるタンパク質をインクジェットプリンティング技術により $\text{NH}_2\text{-Y}$ で示されるアミノ基を導入した適当な基板に吸着固定化し、次いで該タンパク質のシステイン残基のスルフヒドリル基をシアノ化し、シアノシステイン残基に変換させることにより、一般式(4) $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CO-NH-R}_2\text{-CO-NH-Y}$ で示される固定化タンパク質を有するタンパク質アレイを作製することができる。

【００５１】プリンティングに用いるインクジェットプリンタには、インクの射出方法の違いにより、電圧を加えることにより変形する素子（ピエゾ素子）を用いてその変形によりヘッド内のインク収納スペースを減少させ、この圧力によりインクを吐出するピエゾ方式のものと、ノズル中のヒータを加熱することにより泡を生成し、この泡によりインクを押し出すサーマルインクジェット方式のものがあるが、本発明の固定化にはいずれの方式のプリンタも用いることができる。但し、タンパク質の熱による変性を考慮すると、ピエゾ方式のプリンタが好ましい。インクジェットプリンタとしては、市販のプリンタを用いることができ、例えば、EPSON社のPMシリーズのインクジェットプリンタが挙げられる。

【００５２】プリンタのインクカートリッジに上記一般式(2)で示されるタンパク質溶液を充填し、プリンタに設置すればよい。プリンタのプリンティングパターンは描画ソフト等の適当なソフトウェアを利用すれば自由に設定でき、線状に固定化するラインパターンを採用しても、一定面積上に任意の数のドットとして固定化するドットパターンを採用してもよい。また、この際１回に吐出されるタンパク質溶液の量も自由に設定できる。例えば、ラインパターンを採用する場合、幅数十 μm から数百 μm のライン状に固定化すればよい。吐出量、吐出速度を適宜設定すればこの範囲で任意の幅のラインパター

ンで固定化することができる。また、ドットパターンを採用する場合、ドット一つに対して1滴分のタンパク質溶液を吐出して直径数 μm から数百 μm の円状のドットとしてタンパク質を固定化することもできるし、プリンティング時のパターンニングを調整し、一辺が数 μm から数百 μm の矩形にドットを形成させることもできる。この際も、所望のドットパターンによりタンパク質溶液の吐出量や吐出速度を適宜設定すればよい。

【0053】このようにして上記一般式(2)で示されるタンパク質を基板に吸着固定化し、シアノ化試薬により処理して、上記一般式(4)のタンパク質を吸着固定化した固定化基板を得ることができる。シアノ化は、一般式(2)で示されるタンパク質を吸着固定化した基板ごとシアノ化試薬で処理することにより行うことができる。この場合は、基板表面全体にシアノ化試薬を添加するか、あるいは基板ごとシアノ化試薬中に入れてもよい。また、担体にインクジェットプリンタで一般式(2)で示されるタンパク質を吸着固定化した後に、インクジェットプリンタでシアノ化試薬をタンパク質を固定化した部分に適用してもよい。この場合、タンパク質吸着固定化後にカートリッジをシアノ化試薬を充填したものに変え、タンパク質吸着固定化の際と同じパターンでシアノ化試薬を適用してもよいし、複数のタンクを有するカートリッジの別々のタンクにタンパク質溶液とシアノ化試薬を充填させておき、1回の操作で、タンパク質の吐出とシアノ化試薬の吐出が連続的にまたは同時に行われるように設定してもよい。

【0054】さらに、上記一般式(2)で示されるタンパク質をシアノ化し、一般式 $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SCN)-CO-NH-R}_2\text{-COOH}$ で示されるタンパク質を作製した後に、インクジェットプリンタで担体上に吐出することによって、一般式 $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CO-NH-Y}$ で示される固定化タンパク質を作製することができる。この方法によれば、あらかじめシアノ化まで行うことができるという利点がある。固定化させようとするタンパク質の量等に応じて適宜シアノ化のタイミングを決めればよい。

【0055】インクジェットプリンティング技術等により整列固定化したタンパク質は、電子顕微鏡、電気化学顕微鏡等を用いて、その固定化パターンや固定化状態を評価することができる。

【0056】

【実施例】以下、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されない。

【0057】本実施例においては、ジヒドロ葉酸還元酵素、キシラナーゼ、およびキシラナーゼ-ジヒドロ葉酸還元酵素および及び各種蛍光タンパク質を用いて固定化を行った。固定化に用いたタンパク質は、いずれも、一般式(1)に該当するタンパク質アミノ酸配列をコードする遺伝子入手し、カルボキシ末端側の8ないし10のアミノ酸配列と一般式(5)で示されるアミノ酸配列とを結

合したアミノ酸配列をコードする遺伝子を化学合成し、これと、一般式(1)のタンパク質のアミノ末端側の8ないし10アミノ酸配列部をコードする遺伝子部分を化学合成したものをPCRプライマーとして用い、PCR法により増幅することにより、一般式(2)に該当するアミノ酸配列をコードする遺伝子を作製し、これを発現ベクターに組み込み、大腸菌で発現させた後、分離精製することにより作製したものをを用いた。なお、当業者であれば、一般式(1)で示されるタンパク質をコードする遺伝子が入手できれば、一般式(2)で示される本発明に係る固定化に供されるタンパク質を容易に作製できる。

【0058】本実施例において用いる一般式(1)に該当するタンパク質としては、ジヒドロ葉酸還元酵素(配列番号9の1位から159位のアミノ酸)、キシラナーゼ(配列番号10の1位から185位のアミノ酸)、キシラナーゼ-ジヒドロ葉酸還元酵素融合タンパク質(配列番号11の1位から348位のアミノ酸)、および各種蛍光を示す蛍光タンパク質(4種、配列番号1、3、5および7)を用いた。配列番号9、10、11の全長配列はそれぞれ、一般式(2)のタンパク質に該当する。それぞれのタンパク質をコードする遺伝子の入手は、ジヒドロ葉酸還元酵素、キシラナーゼ、およびキシラナーゼ-ジヒドロ葉酸還元酵素融合タンパク質それぞれをコードする遺伝子に関しては、既に本発明者の一人である巖倉らが作製しているものを用い、蛍光タンパク質に関しては、市販されているものを用いた。緑色(GFP)(配列番号1)、青色(BFP)(配列番号3)の蛍光を発する蛍光タンパク質に関してはQUANTUM社より、黄色(YFP)(配列番号5)、赤色(DsRed)(配列番号7)の蛍光を発する蛍光タンパク質それぞれをコードする遺伝子に関してはCLONTECH社より、それぞれ購入した。なお、遺伝子の入手方法により本発明が制限されないことは明白である。

【0059】〔実施例1〕

緑色蛍光タンパク質を用いた固定化反応の検討

一般式(1) $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-COOH}$ に該当するタンパク質として緑色蛍光タンパク質(GFP)(配列番号1)を用いて、一般式(2)に該当する固定化用タンパク質(配列番号2)を作製し、固定化反応の条件等を検討した。該融合タンパク質を、アミノセルロファイン(生化学工業より購入)およびアミノトヨパール(トーソーより購入)を一級アミン担体として用いて固定化した。

【0060】固定化は以下の方法により行った。それぞれのタンパク質を、あらかじめ1000倍量の5mMのエチレンジアミン4酢酸(EDTA)を含むpH8.0の10mM磷酸緩衝液に対して3回以上透析を行い、透析済みのタンパク質サンプルを透析に用いたのと同じ緩衝液で希釈することにより、各種濃度のタンパク質サンプルを調製した。

【0061】このようにして調製した固定化用タンパク質50 μl をアミノセルロファイン(アミン含有量20 μmol

es NH_2/ml) もしくはアミノトヨパール (一級アミン含有量 $130 \mu\text{moles NH}_2/\text{ml}$) $50 \mu\text{l}$ と混合し、2時間以上室温で穏やかに攪拌させた。その後、混合液を1000回転で数秒間遠心して担体を洗め、上澄み液を取り出し、その蛍光強度を測定した。この値と、始めに投入したタンパク質サンプルの蛍光強度と比較することにより、吸着に成功したタンパク質量の割合を求めた。この場合、タンパク質投入量が 1 ml 担体あたり 100 nmoles 以下の場合、投入タンパク質の全て (100%) が担体に吸着固定化された。なお、この状態で吸着固定化されたタンパク質は、 1 M KCl を含む $\text{pH} 8.0$ の 10 mM 磷酸緩衝液で処理することにより、完全に担体から遊離させることができた。このことは、この段階での固定化が担体の一級アミンのプラスチャージと固定化タンパク質に導入したポリアスパラギン酸のネガティブチャージとの間のイオン相互作用によっていることを強く示唆している。

【0062】吸着したタンパク質のシステインのSH基のシアノ化は、吸着固定化した担体を、 5 mM のEDTAを含む $\text{pH} 7.0$ の 10 mM 磷酸緩衝液に懸濁し、最終濃度が 5 mM になるように2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸 (NTCB) を加え、室温で4時間反応させることにより行った。その後、1000回転で数秒間遠心して担体を洗め上澄み液を取り除き、 $\text{pH} 7.0$ の 10 mM 磷酸緩衝液に懸濁する、という操作を5回繰り返すことによりNTCB等を除去した。

【0063】シアノ化処理した吸着固定化タンパク質を、1000回転で数秒間遠心して担体を洗め上澄み液を取り除いた後、 5 mM のEDTAを含む $\text{pH} 9.5$ の 10 mM 磷酸緩衝液に懸濁し、24時間以上室温で穏やかに攪拌させることにより、固定化反応を行った。その後、1000回転で数秒間遠心して担体を洗め上澄み液を取り除き、 1 M KCl を含む $\text{pH} 8.0$ の 10 mM 磷酸緩衝液に懸濁する、という操作を5回繰り返すことで、固定化反応の副反応生成物を除去した。

【0064】以上の操作により、一般式(4)で示され配向制御且つタンパク質のカルボキシ末端の主鎖をアミド結合で結合した固定化タンパク質が得られた。

【0065】なお、シアノ化試薬として、NTCBの代わりに、1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロ硼酸 (1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP)) を用いて、同じ条件でシアノ化反応行っても同様な結果が得られた。

【0066】タンパク質投入量と固定化されたタンパク質量との関係を以下の方法により調べた。

【0067】ジヒドロ葉酸還元酵素、キシラナーゼ、およびジヒドロ葉酸還元酵素-キシラナーゼ融合タンパク質については、紫外領域 (290 nm で励起) の蛍光スペクトルを測定することにより、また、各種蛍光タンパク質については、それぞれのタンパク質の可視領域蛍光スペクトルを測定することにより反応をモニターした。

【0068】分光蛍光光度計 (FP-750; JASCO) を用

い、蛍光スペクトルを測定した。溶液中のタンパク質の蛍光測定は、蛍光タンパク質を $\text{pH} 8.0$ の 10 mM 磷酸緩衝液 3 ml 中に溶解した状態で、蛍光測定用のキュベットに入れて、 25°C で行った。担体に結合した蛍光タンパク質の測定においても、その担体をキュベットの中で常時攪拌することにより、溶液中のタンパク質を測定したのと同じ条件で蛍光スペクトルを測定した。

【0069】蛍光タンパク質のスペクトルが、担体に吸着結合および共有結合で結合することにより長波長側にシフトすることから、吸着のプロセスにおける吸着固定化率 (投入タンパク質量 (A) に対する吸着固定化したタンパク質量 (B) の割合 (B/A)) と、固定化反応のプロセスでの固定化率 (吸着固定化したタンパク質量 (D) に対する最終的に固定化したタンパク質量 (E) の割合 (E/D)) を、それぞれ別々に求めた。求めた値を利用すると、投入タンパク質に対する最終的に固定化タンパク質の割合は、 $(B/A) \times (E/D)$ で表される。ここで吸着固定化のプロセスで蛍光スペクトルのシフトが起こることから、吸着固定化における吸着固定化率の測定においては、投入に用いたタンパク質溶液の蛍光スペクトルと、吸着反応後の吸着後の上澄み液の蛍光スペクトルを測定し、吸着されずに残されたタンパク質量 (これをCとする) を測定し、上記Bの値を、 $B = A - C$ として計算した値を用いた。DとEの測定には、タンパク質を固定化した担体懸濁液を用いて蛍光スペクトルを測定し、タンパク質を固定化していない担体由来するバックグラウンドを補正した値を用いた。

【0070】結果を、図1～図3に示した。図1は、投入タンパク質量と固定化されたタンパク質総量との関係を示す図であり、白丸はアミノセルロファインを、黒丸はアミノトヨパールを示す。図に示すように、投入タンパク質が 1 ml 担体当たり、約 400 nmoles までの範囲においては、投入タンパク質量にほぼ比例して固定化されたタンパク質量が増大したが、それ以上では、固定化が頭打ちになった。

【0071】図2は投入タンパク質量と固定化されたタンパク質の割合 (%) との関係を示す図であり、白丸: アミノセルロファインを、黒丸はアミノトヨパールを示す。図に示すように、投入タンパク質量が 1 ml 担体当たり約 100 nmoles 以下の場合、固定化されたタンパク質の割合は約80%とほぼ一定であったが、それを越えると、固定化の歩留りが徐々に悪くなった。

【0072】図3は、アミノセルロファインに固定化された緑色蛍光タンパク質が示す蛍光スペクトルを示す図であり、図3中に挿入された図は、固定化されたタンパク質量と最大蛍光強度を示す波長 (λ_{max}) との関係を示す図である。アミノセルロファインに固定化された緑色蛍光タンパク質が示す蛍光スペクトルは、担体当たりの固定化量が増えるに従い、長波長側にシフトする傾向が認められた。この蛍光スペクトルの固定化タンパク質

量依存性は、2相性を示し、固定化されたタンパク質間の平均距離の減少による効果を高密度の固定化による固定化されたタンパク質の運動に自由度の減少による効果を反映していることが考えられる。

【0073】緑色蛍光タンパク質を用いた固定化タンパク質は、担体あたりの固定化量が増大するに伴いFRET（蛍光エネルギー移動）による蛍光スペクトルを示す。このことは、タンパク質は配向制御された形で固定化されていること、また高密度に配向制御固定化が達成できることを示している。

【0074】〔実施例2〕担体に吸着後にシアノ化反応を行って得られた固定化タンパク質とシアノ化後に担体に吸着した固定化タンパク質との機能性の比較緑色蛍光タンパク質を固定化担体に吸着させる前にシアノ化する従来法と、本発明の方法により一般式(2)で示される固定化用タンパク質を固定化担体に吸着させた後にシアノ化を行う2通りの方法で、固定化を行い両方法の固定化効率を比較評価した。

【0075】吸着させる前にシアノ化する方法は、特許第3047020号記載の方法に従い以下のように行った。

【0076】5mMのエチレンジアミン4酢酸(EDTA)を含む0.1Mトリス塩酸緩衝液、pH 7.4、中で、緑色蛍光タンパク質の5倍量の2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸(NTCB)を加え、室温で4時間反応させることによりシアノ化反応を行った。遊離するチオニトロ安息香酸の412nmの吸光度の増加（分子吸光係数 $=13,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ）から、ほぼ定量的にシステイン残基がシアノ化されたことが確かめられた。シアノ化反応液からの未反応のNTCB及びチオニトロ安息香酸の除去は、セファデックスG50カラムを用いたゲル濾過により行った。溶離液としては、5mMのEDTAを含むpH9.5の10mM硼酸緩衝液を用いた。この状態のシアノ化したタンパク質サンプルを固定化反応に用いた。

【0077】タンパク質投入量と固定化されたタンパク質量との関係は実施例1に記載の方法と同様の方法により調べた。

【0078】結果を図4に示す。図4は、予めシアノ化した緑色蛍光タンパク質を用いて固定化した場合のシアノ化反応後の放置時間と固定化されたタンパク質との割合との関係を示す図である。図4中、白丸は予めシアノ化した緑色蛍光タンパク質を用いた場合の結果を示し、黒丸は本発明の方法に従った場合の結果を示す。

【0079】事前に、リンカーペプチド鎖中のシステイン残基をシアノ化し、その後リンカーペプチド鎖中に導入した陰電荷を示すペプチド配列と基板とのイオン相互作用による吸着による固定化反応の効率化方法、すなわち従来法の場合、シアノ化システインによる切断反応及びジヒドロアラニン生成反応の副反応がシアノ化システイン形成後時間と共に増大するため、固定化反応効率の低下を招くが、本方法に従うとこの効率低下を完全に防ぐことができる。

【0080】〔実施例3〕

固定化効率の固定化対象タンパク質依存性

ジヒドロ葉酸還元酵素（配列番号9）、キシラナーゼ（配列番号10）、キシラナーゼ-ジヒドロ葉酸還元酵素融合タンパク質（配列番号11）、緑色蛍光タンパク質（GFP）（配列番号2）、青色蛍光タンパク質（BFP）（配列番号4）、黄色蛍光タンパク質（YFP）（配列番号6）および赤色蛍光タンパク質変異体（DSRed）（配列番号8）を一般式(1)のタンパク質として、アミノセルロファインを固定化担体として用いて本発明の方法により固定化を行い、その固定化効率を測定した。前記配列番号はそれぞれのタンパク質をスルフヒドリル基を有するタンパク質と融合させた一般式(5)に相当するタンパク質のアミノ酸配列を示す。

【0081】上記タンパク質を担体としてアミノセルロファインを用いて、実施例1に記載の方法と同様の方法により固定化した。表1に各種タンパク質についての最大固定化効率を示す。

【0082】

【表1】

アミノセルロファイン

固定化対象タンパク質	最大固定化タンパク質割合 (%)
ジヒドロ葉酸還元酵素	>75
キシラナーゼ	>75
キシラナーゼ-ジヒドロ葉酸還元酵素融合タンパク質	>75
GFP	81.4
BFP	88.2
YFP	76.2
DSRed	90.4

GFP以外は、 $\sim 10 \text{ nmol}/\text{ml}$ 担体の条件での値、蛍光タンパク質以外は紫外外部での蛍光測定のため測定後ごとのば

らつきが大きい、いずれの測定においても75%を超える値が得られた。

【0083】〔実施例3〕

固定化効率の固定化担体依存性

固定化担体として、市販されているビーズ状固定化担体である、アミノセルロファイン、アミノトヨパール、AHセファローズ、ポリアリルアミンビーズを用い、固定化タンパク質として緑色蛍光タンパク質（GFP）を用いて

GFPを用いて測定

固定化担体の種類	最大固定化タンパク質割合 (%)
アミノセルロファイン	81.4
アミノトヨパール	82.9
アフィゲル 102	82.8
EAH-セファローズ 4B	66.5
ボラス 20 NH	76.8

アミノセルロファインとアミノトヨパール以外は、～10 nmoles/ml担体の条件での値

【0085】表2の結果は、一級アミンを持つ担体であれば、どのような担体にでも固定化可能であることを示している。

【0086】

【発明の効果】本発明のタンパク質の固定化方法によればタンパク質を配向制御して高い収率で固定化することができる。実施例2に示すように、シアノ化後に固定化

固定化を行った。固定化の方法は実施例1に記載の方法と同様であった。固定化の割合も実施例1記載の方法と同様の方法により調べた。表2に、各種担体における最大固定化効率を示す。

【0084】

【表2】

担体に吸着させる従来法に比べても本発明の方法によれば、より高効率でタンパク質を固定化することができる。

【0087】さらに、インクジェットプリンタを用いて本発明の方法を行うことにより、短時間で多種類のタンパク質を大量に固定化することができ、効率的にタンパク質アレイを作製することができる。

【0088】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> A method for immobilizing a protein with controlling the direction of the protein and a method for producing protein array using the same

<130> 332 - 02022

<140>

<141>

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial sequence

<400> 1

Met Ala Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu

1

5

10

15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly

20

25

30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile

35 40 45
 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60
 Leu Cys Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80
 Arg His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95
 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140
 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160
 Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175
 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190
 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220
 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn
 225 230 235

<;210>; 2

<;211>; 253

<;212>; PRT

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Artificial

sequence

<;400>; 2

Met Ala Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15
 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30
 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45
 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60
 Leu Cys Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80
 Arg His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95
 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr

130 135 140
 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160
 Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175
 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220
 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Asp Asp Asp Asp Asp Asp
 245 250

<;210>; 3

<;211>; 239

<;212>; PRT

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Artificial
sequence

<;400>; 3

Met Ala Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15
 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45
 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60
 Leu Ser His Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80
 Arg His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95
 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140
 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160
 Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175
 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220
 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 225 230 235
 <:210>; 4
 <:211>; 253
 <:212>; PRT
 <:213>; Artificial Sequence
 <:220>;
 <:223>; Description of Artificial Sequence: Artificial
 sequence
 <:400>; 4
 Met Ala Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15
 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30
 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45

 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60
 Leu Ser His Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80
 Arg His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95
 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140
 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160
 Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175
 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190
 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220
 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Asp Asp Asp Asp Asp Asp
 245 250

<:210>; 5
 <:211>; 239
 <:212>; PRT

<:213>; Artificial Sequence

<:220>;

<:223>; Description of Artificial Sequence: Artificial
sequence

<:400>; 5

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu

1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly

20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile

35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr

50 55 60

Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys

65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu

85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu

100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly

115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr

130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn

145 150 155 160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser

165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly

180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu

195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe

210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys

225 230 235

<:210>; 6

<:211>; 253

<:212>; PRT

<:213>; Artificial Sequence

<:220>;

<:223>; Description of Artificial Sequence: Artificial
sequence

<:400>; 6

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu

1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly

20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile

35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60
 Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80
 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95
 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140
 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160
 Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175
 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190
 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220
 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Asp Asp Asp Asp Asp Asp
 245 250

<;210>; 7

<;211>; 225

<;212>; PRT

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Artificial
sequence

<;400>; 7

Met Ala Ser Ser Glu Asn Val Ile Thr Glu Phe Met Arg Phe Lys Val
 1 5 10 15
 Arg Met Glu Gly Thr Val Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly Glu
 20 25 30
 Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly His Asn Thr Val Lys Leu Lys Val
 35 40 45

Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln
 50 55 60
 Phe Gln Tyr Gly Ser Lys Val Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile Pro
 65 70 75 80
 Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg Val
 85 90 95
 Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Ala Thr Val Thr Gln Asp Ser Ser

```

          100          105          110
Leu Gln Asp Gly Cys Phe Ile Tyr Lys Val Lys Phe Ile Gly Val Asn
          115          120          125
Phe Pro Ser Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp Glu
          130          135          140
Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu Lys Gly Glu
          145          150          155          160
Thr His Lys Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Leu Val Glu
          165          170          175
Phe Lys Ser Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Tyr
          180          185          190
Tyr Tyr Val Asp Ala Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp Tyr
          195          200          205
Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Thr Glu Gly Arg His His Leu Phe
          210          215          220

```

Leu

225

<:210>; 8

<:211>; 239

<:212>; PRT

<:213>; Artificial Sequence

<:220>;

<:223>; Description of Artificial Sequence: Artificial
sequence

<:400>; 8

Met Ala Ser Ser Glu Asn Val Ile Thr Glu Phe Met Arg Phe Lys Val

```

      1              5              10              15

```

Arg Met Glu Gly Thr Val Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly Glu

```

          20          25          30

```

Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly His Asn Thr Val Lys Leu Lys Val

```

          35          40          45

```

Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln

```

          50          55          60

```

Phe Gln Tyr Gly Ser Lys Val Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile Pro

```

          65          70          75          80

```

Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg Val

```

          85          90          95

```

Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Ala Thr Val Thr Gln Asp Ser Ser

```

          100          105          110

```

Leu Gln Asp Gly Cys Phe Ile Tyr Lys Val Lys Phe Ile Gly Val Asn

```

          115          120          125

```

Phe Pro Ser Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp Glu

```

          130          135          140

```

Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu Lys Gly Glu

```

          145          150          155          160

```

Thr His Lys Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Leu Val Glu

```

          165          170          175

```

Phe Lys Ser Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Tyr

```

          180          185          190

```

Tyr Tyr Val Asp Ala Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp Tyr

195

200

205

Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Thr Glu Gly Arg His His Leu Phe

210

215

220

Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Asp Asp Asp Asp Asp

225

230

235

<;210>; 9

<;211>; 171

<;212>; PRT

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Artificial
sequence

<;400>; 9

Met Ile Ser Leu Ile Ala Ala Leu Ala Val Asp Arg Val Ile Gly Met

1

5

10

15

Glu Asn Ala Met Pro Trp Asn Leu Pro Ala Asp Leu Ala Trp Phe Lys

20

25

30

Arg Asn Thr Leu Asn Lys Pro Val Ile Met Gly Arg His Thr Trp Glu

35

40

45

Ser Ile Gly Arg Pro Leu Pro Gly Arg Lys Asn Ile Ile Leu Ser Ser

50

55

60

Gln Pro Gly Thr Asp Asp Arg Val Thr Trp Val Lys Ser Val Asp Glu

65

70

75

80

Ala Ile Ala Ala Ala Gly Asp Val Pro Glu Ile Met Val Ile Gly Gly

85

90

95

Gly Arg Val Tyr Glu Gln Phe Leu Pro Lys Ala Gln Lys Leu Tyr Leu

100

105

110

Thr His Ile Asp Ala Glu Val Glu Gly Asp Thr His Phe Pro Asp Tyr

115

120

125

Glu Pro Asp Asp Trp Glu Ser Val Phe Ser Glu Phe His Asp Ala Asp

130

135

140

Ala Gln Asn Ser His Ser Tyr Ser Phe Glu Ile Leu Glu Arg Arg Gly

145

150

155

160

Gly Gly Gly Cys Ala Asp Asp Asp Asp Asp Asp

165

170

<;210>; 10

<;211>; 197

<;212>; PRT

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Artificial
sequence

<;400>; 10

Ala Ser Thr Asp Tyr Trp Gln Asn Trp Thr Asp Gly Gly Gly Ile Val

1

5

10

15

Asn Ala Val Asn Gly Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Val Asn Trp Ser Asn

20

25

30

Thr Gly Asn Phe Val Val Gly Lys Gly Trp Thr Thr Gly Ser Pro Phe

35 40 45
 Arg Thr Ile Asn Tyr Asn Ala Gly Val Trp Ala Pro Asn Gly Asn Gly
 50 55 60
 Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp Thr Arg Ser Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Val Val Asp Ser Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly
 85 90 95
 Thr Val Lys Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Thr Arg
 100 105 110
 Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Asp Gly Asp Arg Thr Thr Phe Thr Gln Tyr
 115 120 125
 Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg Pro Thr Gly Ser Asn Ala Thr Ile
 130 135 140

Thr Phe Ser Asn His Val Asn Ala Trp Lys Ser His Gly Met Asn Leu
 145 150 155 160
 Gly Ser Asn Trp Ala Tyr Gln Val Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Ser Ser Asn Val Thr Val Trp Gly Gly Gly Gly Cys Ala Asp
 180 185 190
 Asp Asp Asp Asp Asp
 195

<:210>; 11

<:211>; 360

<:212>; PRT

<:213>; Artificial Sequence

<:220>;

<:223>; Description of Artificial Sequence: Artificial
sequence

<:400>; 11

Ala Ser Thr Asp Tyr Trp Gln Asn Trp Thr Asp Gly Gly Gly Ile Val
 1 5 10 15
 Asn Ala Val Asn Gly Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Val Asn Trp Ser Asn
 20 25 30

Thr Gly Asn Phe Val Val Gly Lys Gly Trp Thr Thr Gly Ser Pro Phe
 35 40 45
 Arg Thr Ile Asn Tyr Asn Ala Gly Val Trp Ala Pro Asn Gly Asn Gly
 50 55 60
 Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp Thr Arg Ser Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Val Val Asp Ser Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly
 85 90 95
 Thr Val Lys Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Thr Arg
 100 105 110
 Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Asp Gly Asp Arg Thr Thr Phe Thr Gln Tyr
 115 120 125
 Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg Pro Thr Gly Ser Asn Ala Thr Ile
 130 135 140
 Thr Phe Ser Asn His Val Asn Ala Trp Lys Ser His Gly Met Asn Leu

145 150 155 160
 Gly Ser Asn Trp Ala Tyr Gln Val Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Ser Ser Asn Val Thr Val Trp Gly Gly Gly Gly Met Ile Ser
 180 185 190
 Leu Ile Ala Ala Leu Ala Val Asp Arg Val Ile Gly Met Glu Asn Ala
 195 200 205
 Met Pro Trp Asn Leu Pro Ala Asp Leu Ala Trp Phe Lys Arg Asn Thr
 210 215 220
 Leu Asn Lys Pro Val Ile Met Gly Arg His Thr Trp Glu Ser Ile Gly
 225 230 235 240
 Arg Pro Leu Pro Gly Arg Lys Asn Ile Ile Leu Ser Ser Gln Pro Gly
 245 250 255
 Thr Asp Asp Arg Val Thr Trp Val Lys Ser Val Asp Glu Ala Ile Ala
 260 265 270
 Ala Ala Gly Asp Val Pro Glu Ile Met Val Ile Gly Gly Gly Arg Val
 275 280 285
 Tyr Glu Gln Phe Leu Pro Lys Ala Gln Lys Leu Tyr Leu Thr His Ile
 290 295 300
 Asp Ala Glu Val Glu Gly Asp Thr His Phe Pro Asp Tyr Glu Pro Asp
 305 310 315 320
 Asp Trp Glu Ser Val Phe Ser Glu Phe His Asp Ala Asp Ala Gln Asn
 325 330 335

 Ser His Ser Tyr Ser Phe Glu Ile Leu Glu Arg Arg Gly Gly Gly Gly
 340 345 350
 Cys Ala Asp Asp Asp Asp Asp Asp
 355 360

【図面の簡単な説明】

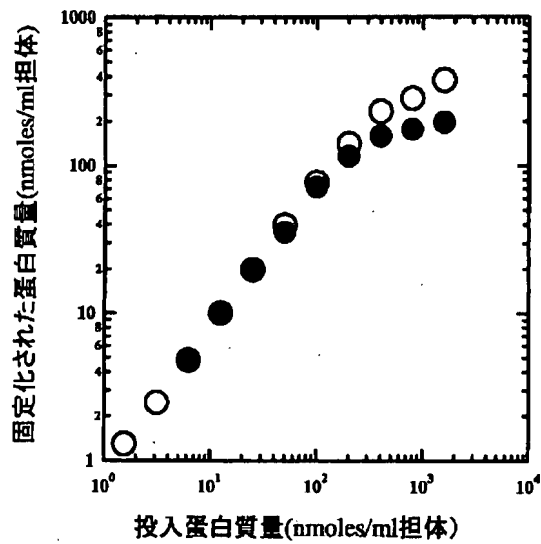
【図1】投入タンパク質量と固定化されたタンパク質総量との関係を示す図である。

【図2】投入タンパク質量と固定化されたタンパク質の割合(%)との関係を示す図である。

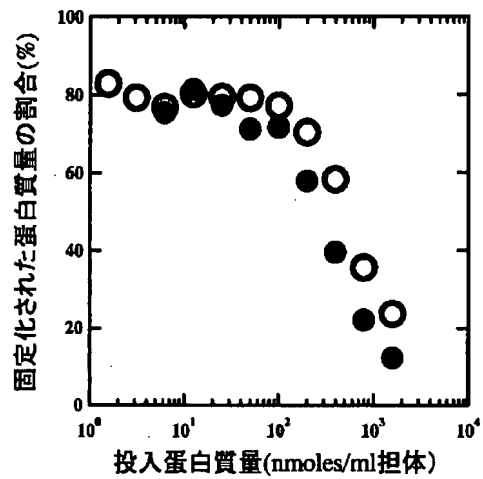
【図3】アミノセルロファインに固定化された緑色蛍光タンパク質が示す蛍光スペクトルを示す図である。

【図4】予めシアノ化した緑色蛍光タンパク質を用いて固定化した場合、シアノ化反応後の放置時間と固定化されたタンパク質との割合との関係を示す図である。

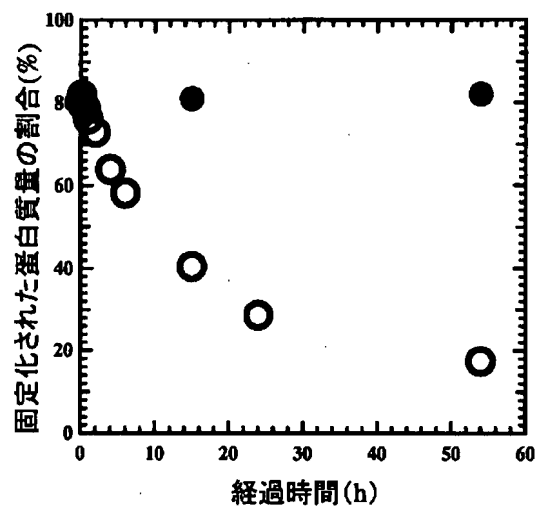
【図1】



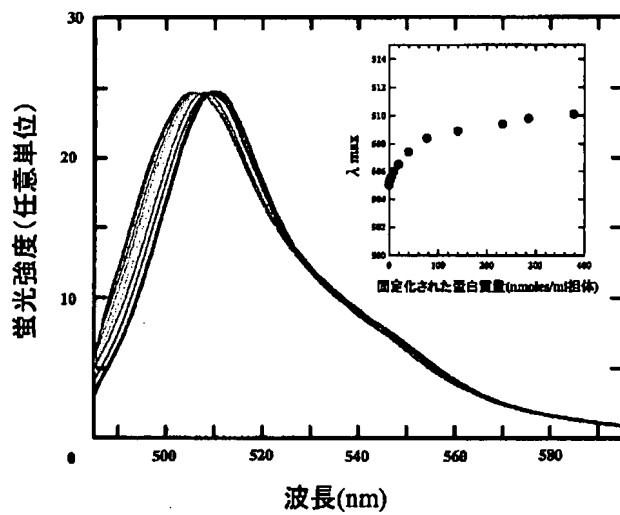
【図2】



【図4】



【図3】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B033 NA01 NA22 NA23 NA26 NA42
 NB33 NB40 NB62 NB63 NC03
 NC04 NC13 ND05
 4H045 AA10 AA20 BA10 BA62 DA89
 EA50 FA51 FA53 FA81 FA82